

## PENGARUH UKURAN DAN JUMLAH FOLIKEL PER OVARI TERHADAP KUALITAS OOSIT KAMBING LOKAL

### *The Effect of the Follicle Size and Follicle Number Per Ovary on Oocyte Quality of Local Goat*

Arman Sayuti<sup>1</sup>, Tongku Nizwan Siregar<sup>2</sup>, Muslim Akmal<sup>3</sup>, Hamdan<sup>4</sup>, dan Hamdani<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

<sup>2, 4</sup>Laboratorium Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

<sup>3</sup>Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

<sup>5</sup>Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

E-mail: abuarman\_73@yahoo.com

#### ABSTRAK

Penelitian bertujuan mengetahui hubungan diameter dan perbedaan jumlah folikel terhadap kualitas oosit kambing lokal. Oosit diperoleh dari ovarium yang berasal dari Rumah Potong Hewan Kota Banda Aceh. Aspirasi oosit dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala. Penelitian ini terdiri dari 2 bagian. Penelitian I, folikel diseleksi dan dibagi dalam 3 kelompok yakni diameter ukuran kecil, sedang dan besar dengan ukuran masing-masing <2, 2-5, dan >5 mm. Penelitian II, jumlah folikel per ovarium dibagi atas 3 kelompok yakni 1 ( $\leq 5$ ), 2 (6-10), dan 3 ( $\geq 11$ ). Diameter diukur menggunakan mikrometer *eyepiece*, sedang morfologi oosit dikategorikan sesuai petunjuk Loneragan *et al.* (1992). Folikel dengan diameter yang lebih besar akan menghasilkan oosit yang lebih besar dengan model regresi  $y = 0,955 + 0,157x$ , y adalah diameter oosit dan x adalah diameter folikel. Hubungan (r) antara diameter folikel dan diameter oosit adalah 0,967. Terdapat perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ) di antara ukuran folikel dan morfologi oosit. Oosit yang berasal dari folikel yang lebih besar cenderung mempunyai morfologi yang lebih baik dibanding oosit yang berasal dari folikel yang lebih kecil.

Kata kunci: oosit, folikel

#### ABSTRACT

*This research was aimed to find out the relationship between the diameter of follicle and the different of follicle number on oocyte quality of local goat. The oocyte originated from the ovary was taken from the Slaughterhouse in Banda Aceh. The ovary was aspirated in the Histology Laboratory of Veterinary Medicine Faculty of Syiah Kuala University, Banda Aceh. This experiment consisted of two stages, the follicles were selected and divided into 3 groups according to their diameter size. The small diameter size <2 mm, medium size 2-5 mm, and big size >5 mm. The second, the ovaries were divided into three groups based on number of follicle, i.e; 1( $\leq 5$ ); 2(6-10); and 3 ( $\geq 11$ ). The diameters of oocyte taken from the three groups of follicle size were measured by using eyepiece micrometer, while the oocyte morphology was categorized into 4 groups. The result of regression data indicated that the biggest follicle diameter yielded the oocyte that had bigger diameter, too. The model of regression is  $y = 0.955 + 0.157x$ , y is the diameter of oocyte and x is the diameter of follicle. The close relationship (r) between the diameter of follicle and the diameter of oocyte was 0.967. There are significant differences ( $P < 0.05$ ) between the size of follicle and the morphology of oocyte. The oocytes originated from larger follicle tend to have better morphological appearance than the oocyte originated from smaller follicle.*

Keywords: oocyte, follicle

## PENDAHULUAN

Pembuahan di luar tubuh (*in vitro fertilization*=IVF) merupakan generasi ketiga perkembangan bioteknologi reproduksi hewan. Teknologi ini telah banyak diterapkan pada beberapa hewan piara seperti sapi, kambing, kerbau dan domba. Fertilisasi *in vitro* merupakan teknologi yang potensial untuk memproduksi embrio dalam jumlah banyak.

Perkembangan embrio secara *in vitro* dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan. Pada faktor genetik terutama akan dipengaruhi oleh induk dan pejantan (Sumantri dan Anggraeini, 1999), sedang faktor utama dari segi lingkungan adalah kualitas oosit yang digunakan. Faktor yang menentukan kualitas oosit tersebut adalah diameter dan morfologinya (Arlotto *et al.*, 1996).

Oosit babi yang mempunyai diameter lebih besar akan mempunyai kemampuan yang lebih besar untuk mencapai meiosis I (Tsafiriri *et al. cit.* Arlotto *et al.*, 1996), oosit domba yang berasal dari folikel yang lebih besar mempunyai peluang yang lebih besar untuk mencapai metaphase II dibanding oosit yang berasal dari folikel yang berdiameter lebih kecil (Lonergan *et al.*, 1994), serta oosit sapi yang berasal dari folikel antrum yang kecil mempunyai kemampuan yang rendah untuk mengalami *germinal vesicle breakdown* (GVBD) dan metaphase I (Pavlok *et al.*, 1992).

Takagi *et al. cit.* Sumantri dan Anggraeini (1999) menyatakan terdapat korelasi positif antara diameter folikel dengan perkembangan embrio, yakni akan ditemukan embrio pada tahap morula dan blastula pada folikel dengan diameter yang lebih besar. Sampai sejauh ini masih

terdapat perbedaan pendapat mengenai faktor-faktor yang menentukan tingkat perkembangan embrio setelah fertilisasi *in vitro*. Sebagian pendapat menggunakan diameter oosit sebagai cara mengukur kemampuan maturasi dan perkembangan, sedang pendapat yang lain menggunakan diameter folikel sebagai tolak ukur keberhasilannya.

Di samping diameter oosit, kualitas oosit juga ditentukan oleh morfologi oosit itu sendiri. Lonergan *et al.* (1992) membuktikan hubungan yang kuat antara morfologi oosit dan embrio yang dihasilkan. Oosit dengan tipe kompak mempunyai angka fertilisasi yang lebih tinggi dibanding oosit dengan tingkat lapisan kumulus yang lebih rendah. Crozet *et al.* (1994) membuktikan hanya kumulus-oosit yang kompak yang dapat digunakan untuk fertilisasi *in vitro*.

Proses pematangan oosit dan pertumbuhan embrio awal sangat dipengaruhi oleh fungsi *follicle stimulating hormone* (FSH) yang dihasilkan oleh hipofisa anterior. Sumantri dan Anggraeini (1999) menyatakan bahwa ovarium dengan folikel yang banyak akan memberi gambaran FSH yang tinggi. Hormon ini merupakan hormon perangsang pertumbuhan folikel dan pematangan oosit di dalam folikel melalui peningkatan proliferasi sel folikuler dan perubahan steroid androgenik menjadi golongan estrogen. Semakin berkembang folikel maka besar dan kualitas oosit semakin meningkat (Marks *et al.*, 2000).

Sampai sejauh ini belum terdapat informasi yang melaporkan hubungan antara diameter folikel dan jumlah folikel per ovarium terhadap kualitas oosit kambing lokal. Oleh karena itu, diperlukan suatu penelitian yang dapat menjelaskan kualitas oosit kambing lokal yang diperoleh dari beberapa kategori folikel sehingga akan

diperoleh suatu ketetapan bahwa ukuran dan jumlah folikel dapat dijadikan metode untuk mengukur kualitas oosit.

## MATERI DAN METODE

### Koleksi Oosit

Oosit yang digunakan dalam penelitian ini bersumber dari ovarium yang berasal dari Rumah Potong Hewan Kota Banda Aceh. Ovarium diaspirasi di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh. Pada penelitian I, folikel diseleksi dan dibagi atas 3 kelompok berdasarkan ukuran diameternya. Diameter kecil berukuran <2 mm, sedang 2-5 mm dan besar >5 mm. Pada penelitian II, ovarium dibagi atas 3 kelompok berdasarkan jumlah folikel. Kelompok 1 memiliki folikel ≤5, kelompok 2 memiliki folikel 6-10, dan kelompok 3 memiliki folikel ≥11.

### Prosedur Aspirasi

Koleksi oosit menggunakan metode aspirasi dengan *disposable syringe* 5 ml + jarum 18 G. Prosedur aspirasi adalah sebagai berikut:

1. Sedot sedikit cairan NaCl fisiologis steril, tusukkan jarum ke sekitar folikel dan sedot, masukkan ke dalam tabung reaksi steril tambah NaCl. Cairan kelihatan akan menguning. Hindarkan folikel yang mengandung darah (folikel berwarna hitam), karena akan mengotori semua cairan dalam tabung.
2. Biarkan cairan dalam tabung mengendap, oosit akan berada dalam lapisan bawah (agak kasar), di lapisan atas akan berupa debris (jaringan lembut dan halus).
3. Buang dengan cara menyedot bagian atasnya, sisakan sedikit cairan sehingga

tidak sampai menyentuh debris tambah oosit tadi. Tambahkan cairan NaCl fisiologis baru, kemudian dijentik perlahan-lahan dengan tujuan seperti mencuci. Biarkan mengendap lagi.

4. Setelah mengendap usahakan mengambil bagian bawah saja (oosit) dengan pipet steril.
5. Oosit dimasukkan ke dalam cawan petri ukuran 90 x 200 mm tambah NaCl fisiologis (bagian bawah cawan petri digaris kotak-kotak. Kualitas oosit yang diperoleh diperiksa di bawah mikroskop stereo.

### Diameter dan Morfologi Oosit

Diameter oosit dari ketiga kelompok ukuran folikel diukur menggunakan mikrometer *eyepiece*, sedang morfologi oosit dikategorikan atas 4 kelompok seperti yang diklasifikasikan oleh Lonergan *et al.* (1992), yaitu:

1. *Complete*, terdapat sel-sel kumulus oophorus, terdiri lebih dari 3 lapisan tebal (5 lapisan), oosit kelihatan kompak.
2. *Expanded*, terdapat sel-sel kumulus oophorus, terdiri dari 3 (3-5) lapisan tebal, dengan salah satu bagian tidak utuh.
3. *Partial*, terdapat hanya 2 lapisan sel-sel kumulus oophorus.
4. *Nude*, tidak ada sel-sel yang mengelilingi oosit, oosit hanya dikelilingi zona pellucida secara merata.

Berdasarkan morfologi oosit tersebut, maka oosit dikelompokkan lagi menjadi:

- Oosit kategori baik, yakni oosit dengan morfologi *complete* dan *expanded*.
- Oosit kategori sedang, yakni oosit dengan morfologi *partial*.

- Oosit kategori buruk, yakni oosit dengan morfologi *nude*.

Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Pengaruh ukuran folikel terhadap diameter oosit dianalisis menggunakan analisis regresi dan korelasi sederhana sedang pengaruh ukuran dan jumlah folikel terhadap morfologi oosit dianalisis menggunakan analisis varians satu arah. Analisis data dilakukan dengan *software* SPSS 7,0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Diameter Folikel Terhadap Diameter Oosit

Rata-rata diameter oosit dalam beberapa kategori folikel dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata diameter oosit dalam beberapa kategori folikel

Ukuran folikel (mm)	n	Rata-rata diameter oosit (µm)
1	3	1,2±0,000
2	4	1,3±0,000
3	13	1,4±0,000
4	11	1,5±0,046
5	15	1,7±0,045
6	4	1,9±0,050

Analisis data menunjukkan bahwa semakin besar diameter folikel akan menghasilkan oosit yang berdiameter lebih besar. Model regresi yang didapat adalah  $y = 0,955 + 0,157x$ . Keeratan hubungan ( $r$ ) antara diameter folikel terhadap diameter oosit adalah sebesar 0,967. Hal ini menunjukkan hubungan yang sangat erat (mendekati 1). Arah hubungan yang positif menunjukkan semakin besar diameter akan membuat diameter oosit cenderung me-

ningkat. Koefisien regresi sebesar 0,157 menyatakan bahwa setiap penambahan 1 mm diameter folikel akan meningkatkan diameter oosit sebesar 0,157 µm. Peningkatan diameter folikel menyumbang sebesar 93,5% terhadap peningkatan diameter oosit.

Lonergan *et al.* (1991) menyatakan terdapat hubungan yang erat antara diameter folikel terhadap kemampuan oosit untuk berkembang. Oosit yang berasal dari folikel berdiameter ≤2 mm mempunyai kemampuan tumbuh lebih rendah dibanding oosit yang berasal dari folikel berdiameter 2-6 mm, dan oosit yang berasal dari folikel berdiameter >6 mm mempunyai kemampuan tumbuh yang nyata lebih tinggi. Selanjutnya Crozet *et al.* (1994) menyatakan bahwa oosit yang berasal dari folikel besar memiliki persentase yang lebih tinggi untuk mencapai stadium blastosis dibanding oosit yang berasal dari folikel yang lebih kecil.

Arlotto *et al.* (1996) telah menguji hubungan antara diameter oosit dengan pertumbuhan folikel. Oosit terus bertumbuh setelah pembentukan antrum, yang melibatkan oosit yang berasal dari folikel berukuran 10-15 mm. Perbedaan diameter oosit yang berasal dari folikel besar dengan folikel kecil sekitar 5%. Perbedaan diameter oosit akan berpengaruh terhadap perkembangan oosit mulai perkembangan dini sampai blastosis.

Pengaruh diameter oosit terhadap kemampuannya untuk berkembang mungkin berhubungan dengan lama pembentukan polar bodi pertama. Semakin cepat polar bodi pertama terbentuk (matang lebih awal) akan meningkatkan keberhasilan dalam pembentukan blastosis (Dominko dan First, 1992). Oosit yang matang lebih awal cenderung pada oosit yang memiliki diameter lebih besar (Arlotto *et al.*, 1996).

**Pengaruh Diameter Folikel terhadap Kualitas Oosit**

Sebanyak 354 oosit berhasil diaspirasi dari 80 buah ovarium kambing lokal yang memiliki folikel permukaan. Folikel-folikel tersebut diklasifikasikan atas 3 kelompok, yakni folikel kecil (diameter <2 mm), folikel sedang (diameter 2-5 mm), dan folikel besar (diameter >5 mm). Terdapat perbedaan yang signifikan antara ukuran folikel terhadap morfologi oosit seperti yang terlihat pada Tabel 2.

Hasil yang diperoleh pada penelitian ini sesuai dengan penelitian Crozet *et al.* (1994) yang memperoleh kompleks kumulus-oosit (COCs) lebih banyak pada kelompok folikel berukuran sedang (3,1-5 mm) dan besar (>5 mm) dibanding COCs yang berasal dari folikel kecil (2-3 mm) yang masing-masing sebesar 84 dan 87% dibanding 62%. Selanjutnya, Martino *et al.* (1994) membuktikan terdapat perbedaan yang signifikan antara oosit yang berasal dari folikel berukuran 3,0-6,0 mm dengan oosit yang berasal dari folikel berukuran 2,5-6,0 mm terhadap kemampuan mengalami maturasi pada kambing prepubertas yakni sebesar 88,0 dan 72,47%.

Meningkatnya kualitas oosit pada folikel yang besar mungkin disebabkan oleh lingkungan-intrafolikular folikel yang dapat memperbaiki kualitas oosit. Lingkungan intrafolikular folikel yang dimaksud adalah

hormon steroid dan peptida, faktor-faktor pertumbuhan, sitokin, dan molekul-molekul lain yang mungkin beraksi tunggal atau bersama-sama dengan satu atau lebih faktor-faktor lain yang mempengaruhi oosit dan perkembangan folikel (Lonergan *et al.*, 1991).

Assey *et al.* (1994) menyatakan lingkungan intrafolikular pada folikel dominan didominasi oleh estrogen, sel-sel kumulus yang kompak yang berhubungan dengan oosit. Sebaliknya, pada folikel subordinat ditandai oleh dominasi progesteron dan sel-sel kumulus yang berdegenerasi. Pada babi, oosit akan berkembang cepat secara *in vivo* jika lapisan sel teka dan lapisan sel granulosa terdapat lebih kompleks. Hal ini hanya akan diperoleh dari folikel yang berukuran lebih besar (King *et al.*, 1991).

Dari Tabel 2 terlihat bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan kualitas oosit yang berasal dari folikel sedang maupun besar dalam menghasilkan oosit kategori baik, tetapi berbeda dalam menghasilkan oosit kategori sedang. Hal ini dapat mendukung pernyataan Eppig *et al.* (1994) bahwa setengah dari oosit yang berasal dari folikel sedang mampu mengalami fertilisasi normal, tetapi sebagian lagi gagal berkembang sampai stadium di atas 8-16 sel. Oosit kategori baik biasanya akan mampu berkembang sampai

Tabel 2. Pengaruh ukuran folikel terhadap kualitas oosit

Ukuran folikel	Jumlah oosit	Baik	Sedang	Buruk
Kecil	75	0,0% (0/75) <sup>a</sup>	16,0% (12/75) <sup>a</sup>	84,0% (63/75) <sup>a</sup>
Sedang	163	27,6% (45/163) <sup>b</sup>	35,6% (58/163) <sup>b</sup>	36,8% (60/163) <sup>a</sup>
Besar	116	51,8% (59/116) <sup>b</sup>	28,1% (34/116) <sup>c</sup>	20,2% (23/116) <sup>b</sup>

Keterangan: <sup>a,b,c</sup> Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,01)

Tabel 3. Jumlah oosit yang diperoleh berdasarkan perbedaan jumlah folikel per ovari pada ovarium kambing lokal

Jumlah folikel	Jumlah oosit	Baik	Sedang	Buruk
≤ 5	42	28,6% <sup>a</sup>	47,6% <sup>a</sup>	23,9% <sup>a</sup>
6-10	101	27,7% <sup>a</sup>	33,7% <sup>a</sup>	39,6% <sup>b</sup>
≥ 11	147	30,0% <sup>b</sup>	34,0% <sup>b</sup>	36,0% <sup>b</sup>

Keterangan: <sup>a,b</sup> Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,01)

stadium blastosis, sedang pada kategori sedang akan mengalami kegagalan disebabkan oleh ketiadaan beberapa tipe mRNA.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara folikel sedang dan besar dalam menghasilkan oosit kategori baik (Tabel 2). Hal ini dapat dijadikan patokan dalam menetapkan folikel yang akan dipilih untuk IVM dan IVF. Oosit kategori sedang dan buruk tidak begitu penting dipertimbangkan saat koleksi, karena oosit pada kedua kategori tersebut tidak menghasilkan embrio (0%) setelah IVM dan IVF (Lonergan *et al.*, 1992).

**Pengaruh Jumlah Folikel Per Ovari terhadap Kualitas Oosit**

Data mengenai jumlah oosit yang diperoleh pada ketiga kelompok berdasarkan jumlah folikel per ovari dapat dilihat pada Tabel 3.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perbedaan jumlah folikel memberi pengaruh terhadap jumlah oosit yang dihasilkan. Hal ini mengindikasikan bahwa semakin banyak folikel maka makin banyak oosit yang dikoleksi. Kondisi ini disebabkan karena secara normal satu folikel mengandung satu oosit.

Hasil analisis menunjukkan terdapat perbedaan sangat nyata (P<0,01) antara ketiga kelompok perlakuan untuk mendapatkan oosit kategori baik (*complete* dan *expanded*). Hal yang sama juga terlihat pada

kategori sedang (*partial*) dan buruk (*nude*). Tingginya jumlah oosit kategori baik pada kelompok 3 kemungkinan disebabkan banyaknya folikel pada permukaan ovarium yang mengindikasikan tingginya hormon FSH. Fungsi FSH adalah merangsang pertumbuhan folikel dan pematangan oosit di dalam ovarium. Hormon ini bekerja pada reseptor FSH di sel granulosa ovarium untuk meningkatkan perubahan steroid androgenik menjadi golongan estrogen terutama estradiol (Marks *et al.*, 2000) serta menginduksi proliferasi sel dari selapis sel folikuler menjadi kuboid. Selanjutnya, sel folikel berubah menjadi epitel berlapis melalui pembelahan mitosis (Junqueira dan Carneiro, 1982).

**KESIMPULAN**

- 1. Diameter oosit mempunyai hubungan yang erat dengan diameter folikel. Model regresinya adalah  $y = 0,955 + 0,157x$ .
- 2. Peningkatan diameter folikel akan meningkatkan kualitas oosit kambing lokal.
- 3. Peningkatan jumlah folikel per ovari akan meningkatkan kualitas oosit kambing lokal.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arlotto, T., J.L. Schwarctz, and N.L. First. 1996. Aspect follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**. 45:943-956.
- Assey, R.J., P. Hyttel, T. Greeve, and B. Purwantara. 1994. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. **Mol. Reprod. and Developm.** 37:335-344.
- Crozet, N., M. Ahmet-Ali, and M.P. Dubos. 1994. Developmental competence of goat oocytes from follicle of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. **J. Reprod. And Fert.** 103:293-298.
- Dominko, T. and N. Fisrt. 1992. Kinetics of bovine oocyte maturation and is affected by gonadotropins. **Theriogenology**. 37:203 (abstr.).
- Eppig, J.J., R.M. Schultz, M. O'Brien, and P. Chesnel. 1994. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. **Developm. Biol.** 164:1-9.
- Junqueira, L.C. and J. Carneiro. 1982. **Histologi Dasar**. Edisi 3. Penerbit EGC, Jakarta.
- King, R.S., A.A. Grippio, and G.J. Killian. 1991. Bovine estrus-associated protein stimulates capacitation of bull sperm. **Biol. of Reprod.** 44 (Suppl. 1). 135 (Abstr.)
- Lonergan, P., P. Monaghan, D. Rizos, M.P. Boland, and I. Gordon. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Mol. Reprod. and Developm.** 37:48-53
- Lonergan, P., H. Sharif, and I. Gordon. 1992. Effect of time to transfer to granulosa cells monolayer on bovine oocyte developmental following IVM/IVF/IVC. **Proceeding of the 8th Conference of the European Embryo Transfer Association**. 178.
- Lonergan, P., H. Sharif, P. Monaghan, H. Wahid, M. Gallagher, and I. Gordon. 1991. The effect of follicle size on the type of bovine oocyte obtained for in vitro maturation. **Proceeding of Seventh Meeting of the European Embryo Transfer Association**. (Cambridge). 162.
- Marks, D.B., A.D. Marks dan C.M. Smith. 2000. **Biokimia Kedokteran Dasar: Sebuah Pendekatan Klinis**. Penerbit EGC, Jakarta.
- Martino, A., T. Mogas, M.J. Palomo, and M.T. Paramio. 1994. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**. 41:968-980.
- Pavlok, A., A. Lucas-Hahn, and H. Nieman. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Mol. Reprod. and Developm.** 31:63-67.
- Sumantri, C. dan A. Anggraeini. 1999. Hubungan jumlah folikel per ovarium dengan kualitas oosit dan lama hari terbentuknya blastosit fertilisasi *in vitro* pada sapi Fries Holland. **Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner**. 4(4):142-149.